

## UJI SITOTOKSISITAS, ANTIPROLIFERATIF, DAN PENGARUHNYA TERHADAP EKSPRESI P53 DAN BCL2 DARI FRAKSI ETANOL INFUSA DAUN TEH (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) TERHADAP SEL HeLa

### CYTOTOXICITY, ANTIPROLIFERATIVE ASSAYS, AND EXPRESION OF P53 AND BCL2 OF ETHANOLIC FRACTION FROM TEA (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) LEAVES INFUSE TO HeLa CELLS

Laela Hayu Nurani

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

#### ABSTRAK

Daun teh (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) merupakan salah satu bahan alam yang digunakan masyarakat untuk pengobatan tradisional sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksitas, antiproliferatif, dan mekanisme terhadap p53 dan bcl-2 dari fraksi etanol infusa daun teh (*Camellia sinensis* (L.) O.K.). Daun teh yang diperoleh, diekstraksi dengan cara infundasi dan difraksinasi dengan pelarut etanol. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menginkubasi sel HeLa dengan kepadatan  $2.10^4$  dengan perlakuan ekstrak kadar 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 62,5; 31,25; 15,63; dan 7,81  $\mu\text{g}/\text{mL}$  selama 24 jam. Uji antiproliferatif dilakukan dengan menghitung jumlah sel hidup pada perlakuan sampel kadar 31,25; 15,63; 7,81; dan 3,91  $\mu\text{g}/\text{mL}$  setelah diinkubasi pada jam ke-24, 48 dan 72. Uji imunositokimia dilakukan pada konsentrasi sebesar 24,45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dengan antibodi p53 dan bcl-2. Ekspresi p53 dan bcl-2 dibandingkan dengan kontrol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel fraksi etanol dari infusa daun teh (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) bersifat sitotoksik terhadap sel HeLa dengan harga  $LC_{50}$  sebesar 24, 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Hasil uji doubling time diperoleh doubling time kontrol pelarut 74,11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan kontrol sel 78,22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sedangkan pada perlakuan kadar 31,25; 15,63; 7,81; dan 3,91  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diperoleh harga slope yang negatif sehingga tidak diperoleh harga doubling time. Ekstrak tersebut dapat memacu ekspresi p53 dan menghambat ekspresi bcl-2 dibandingkan dengan kontrol.

Kata Kunci: *Camellia sinensis*, HeLa, p53, bcl-2

#### ABSTRACT

Tea (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) is one of medical plant traditionally used by society as anticancer. The aim of this research is to evaluate the cytotoxic and antiproliferative effect of ethanolic fraction of tea (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) and its effect on P53 and bcl-2. Tea were collected and extracted by infundation and fractioned with ethanol as solvent. Cytotoxicity test was done by incubating HeLa cell at a density of  $2.10^4$  with treatment using extract in concentration of 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; and 7,81  $\mu\text{g}/\text{mL}$  during 24 hours. Antiproliferative test were done by calculating doubling time which was equaling a life cell on treatment sample concentration 31,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 15,63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 7,81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; and 3,91  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with cell control at 24, 48 and 72 hours. Immunohistochemistry assay was used in  $LC_{50}$  with p53 and bcl-2 antibody. P53 and bcl-2 expression is compared to control. The result indicated that ethanol fraction of tea (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) leaf infuse has cytotoxicity effect on HeLa cell with  $LC_{50}$  of 24,45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The result of doubling time test indicated that doubling time value for a solvent control is 74,11 hours and a cell control is 78,22 hours. While, with treatment 31,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 15,63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 7,81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; and 3,91  $\mu\text{g}/\text{mL}$  resulted on negative slope then did not produce doubling time. The extract can induce p53 expression and inhibit bcl-2 expression compared to control.

Key words: *Camellia sinensis*, HeLa, p53, bcl-2

## PENDAHULUAN

Kanker leher rahim atau disebut juga kanker serviks adalah sejenis id.wikipedia.org/wiki/ Kanker yang 99,7% disebabkan oleh *human papilloma virus* (HPV) onkogenik, yang menyerang leher rahim (Canavan and Doshi, 2000). Jumlah kematian akibat kanker serviks di dunia diperkirakan lebih dari 300 000 per tahun, dan banyak dari mereka yang meninggal adalah ibu-ibu muda. Keterjadian kanker leher rahim di Indonesia menempati posisi pertama dibandingkan dengan kanker yang lain (Tjindarbumi, 2000).

Berdasarkan kondisi tersebut perlu pencarian cara untuk menurunkan angka keterjadian tersebut. Pengobatan dapat dilakukan dengan distruksi lokal, misalnya kauterisasi sampai dengan pengangkatan rahim sederhana (histerektomi), sedang pada kanker *invasive*, umumnya pengobatan adalah dengan cara operasi, radiasi, kemoterapi atau kombinasi (Azis, 2001). Kemoterapi dengan antikanker diharapkan memiliki selektivitas yang tinggi tanpa berefek pada sel jaringan normal. Penelusuran mekanisme antikanker pada gen yang berperan pada keterjadian kanker akan membuat selektivitasnya lebih tinggi (Nafrialdi, 2004).

Penyebab paling utama kanker servik adalah anggota familia Papovirida yaitu HPV (Human Papiloma Virus) yang mempunyai diameter 55  $\mu\text{m}$  dan virus ini ditularkan secara seksual. HPV memiliki kapsul isohedral yang telanjang dengan 72 kapsomer, serta mengandung DNA *circular double stranded* (Nishimura, et al., 2006). Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7 yang berpengaruh pada E2F5 dalam siklus sel terutama fase sintesis protein. Protein E6 berikatan dengan tumor suppressor protein p53 dan mempercepat degradasi p53 dan protein E7 dapat mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari pRb. Adanya hambatan kerja p53 oleh E6 dan E7 berpengaruh pada regulasi sel. Gen lain yang dipengaruhi oleh HPV adalah *bcl-2*, dimana terjadi overekspresi gen tersebut pada sel HeLa (Teissier et al., 2010)

Banyak sekali resep tradisional yang menggunakan berbagai macam tanaman untuk pengobatan kanker, termasuk diantaranya daun teh (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) yang merupakan tanaman yang sangat terkenal di masyarakat sebagai minuman yang menyegarkan. Pengaruhnya terhadap kesehatan ini, dari berbagai penelitian diketahui terutama disebabkan oleh adanya kandungan flavonoid teh yang disebut dengan katekin yang memiliki sifat antioksidan yang berperan dalam melawan radikal bebas yang dapat menimbulkan berbagai penyakit (Akroum, et al., 2007). Senyawa epigalokatekin galat (EGCG) yang dikandung teh hijau mampu menghambat pertumbuhan sel kanker (Li et al., 2004). Selain itu teh mengandung senyawa tannin, alkaloid, serta polifenol-polifenol yang berperan sebagai antioksidan, antibakteri, maupun antikanker (Li et al., 2004; Akroum, et al., 2007). Pengujian pengaruh fraksi etanol infusa daun teh terhadap ekspresi p53 dan bcl-2 diperlukan untuk mengetahui mekanisme kerjanya secara spesifik.

## METODOLOGI

### Alat dan Bahan

*Haemocytometer*, *sentrifuge*, panci infus, alat-alat gelas, autoklaf, oven, ELISA reader, inkubator CO<sub>2</sub>, *laminar air flow cabinet*, *tissue culture flask*, tabung *conical*, *cell counter*, *microplate* 24 dan 96 sumuran.

Daun teh, sel HeLa, Etanol 96%, FBS (*Fetal Bovine serum*) 10%, etanol 70%, Tripsin EDTA, DMSO 1%, Akuades, RPMI 1640, PBS (*Phospat buffer saline*), penisilin-sterptomisin 1% v/v, SDS 10% dalam HCl 0,01 N, NaHCO<sub>3</sub>, HEPES, Fungison 0,5 % (v/v) (Gibco), antibody p53, antibodi BCL-2 (sigma).

### Jalannya Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bersifat eksploratif. Penelitian ini terbagi memnaji beberapa tahap yaitu pembuatan ekstrak, pengujian sitotoksik, antiproliferatif, serta imunositokimia terhadap ekspresi p53 dan bcl-2 sel HeLa.

### Determinasi tanaman dan pembuatan ekstrak

Tanaman *Camellia sinensis* (L.) O.K. yang akan digunakan dalam penelitian dideterminasi di laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta, berpedoman pada buku *Flora of Java* karangan Backer dan Van Den Brink, 1965.

---

**Korespondensi : Laela Hayu Nurani**  
**Alamat : Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan**  
**Jl. Prof. Dr. Soepomo Janturan Yogyakarta**  
**Email : laelagrין@yahoo.com**

Pembuatan infusa dilakukan dengan cara serbuk daun teh ditimbang sebanyak 200 gram dimasukkan dalam panci infusa ditambah akuades 2400 mL dan dipanaskan selama 15 menit, dihitung mulai suhu mencapai 90°C kemudian disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Langkah selanjutnya ekstrak dilarutkan dalam etanol 70% sehingga didapat fraksi etanol dari infusa dan kemudian diuapkan. Fraksi etanol dari infusa daun teh ditimbang 100 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO. Kemudian larutan tersebut dibuat seri kadar yaitu kadar 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,63 µg/mL; dan 7,81 µg/mL yang selanjutnya diujikan pada sel HeLa.

#### **Pembuatan media biakan dan media penumbuh sel**

Media biakan dibuat dengan melarutkan RPMI 1640 10,4 gram ditambah 2,0 gram NaHCO<sub>3</sub> dan 2,0 gram HEPES. Larutan selanjutnya distirer sampai homogen kemudian dibuffer dengan HCl 1 N hingga pHnya 7,2 – 7,4 menggunakan pH meter. Selanjutnya larutan tersebut disaring dengan filter polietilen sulfon steril 0,2 mikrometer secara aseptis.

Media penumbuh sel dibuat dengan cara mencampurkan FBS 10% sebanyak 30,0 ml, fungison 1,5 mL dan penstrep 3,0 mL ke dalam media sampai 100,0 mL. Selanjutnya larutan disaring dengan filter polietilen sulfon 0,2 mikrometer secara aseptis.

#### **Preparasi sel HeLa Pengaktifan sel HeLa**

Sel diambil dari tangki Nitrogen cair, segera dicairkan dalam suhu 37°C kemudian ampul disemprot dengan etanol 70% kemudian sel dipindahkan ke dalam tabung conical steril yang berisi media RPMI 1640. Suspensi disentrifuge 1500 rpm selama 5 menit kemudian supernatan dibuang, pellet putih yang terdapat didasar tabung conical adalah koloni sel, ditambah medium penumbuh yang mengandung 10% FBS dan disuspensi perlahan hingga homogen. Sel ditumbuhkan dalam 3-4 buah *tissue culture flask* kecil kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° dengan aliran 5% CO<sub>2</sub>.

#### **Panen sel HeLa**

Setelah jumlah sel cukup, medium diganti dengan medium tertentu sebanyak 5 ml dan sel dilepas dari dinding flask menggunakan scraper.

Sel dipindahkan ke dalam tabung *conical* steril dan ditambahkan medium sampai volume 10 mL dan disentrifuge 2000 rpm selama 5 menit. Suspensi sel ditambah sejumlah medium sehingga diperoleh konsentrasi sel sebesar  $2 \times 10^4$  sel/100 µL.

#### **Uji sitotoksitas dan antiproliferatif**

Sampel 100 µL dalam media RPMI 1640 dengan konsentrasi 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,63 µg/mL; dan 7,81 µg/mL masing-masing dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran yang berbeda, kemudian ditambahkan 100 µL suspensi sel pada tiap sumuran tersebut dengan kepadatan sel  $2 \times 10^4$  sel per sumuran. Selanjutnya kultur inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam pada suhu 37°C.

Tiap sumuran diambil medianya sampai habis hingga tersisa sel yang menempel pada dasar sumuran, kemudian dicuci dengan PBS 100 µL (PBS diambil kembali) dan ditambahkan tripsin EDTA 100 µL. Selama kurang lebih 3 menit diresuspensi dan diambil 10 µL untuk dihitung jumlah selnya menggunakan *haemocytometer*. Sel yang mati akan tampak keruh tidak bercahaya.

Uji antiproliferatif dilakukan pada kadar di bawah LC<sub>50</sub> dengan sampling pada jam ke-24, 48, 72. Waktu penggandaan sel (*doubling time*) diperoleh dari persamaan kurva hubungan antara waktu inkubasi dan log jumlah sel hidup.

#### **Uji imunositokimia**

Ke dalam suspensi sel pada setiap sumuran yang berbeda (kepadatan sel  $5 \times 10^5$  sel/mL) ditambahkan 1000 µL sampel dalam media kultur RPMI 1640 hingga dicapai seri kadar akhir dalam sumuran yaitu 24,45 µg/mL. Pada kelompok kontrol, 1000 µL sampel diganti dengan 1000 µL media kultur. Selanjutnya plate diinkubasikan dalam inkubator 5.% CO<sub>2</sub> selama 24 jam pada suhu 37 °C. Sel yang telah diinkubasi kemudian dipanen dan dibuat apusan pada gelas obyek (*poly-l-lysine slide*) untuk diuji secara imunositokimia menggunakan antibodi (IgG) primer monoklonal p53 dan bcl-2 diamati menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan protein p53 dan bcl-2 akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan yang tidak akan memberikan warna ungu/ biru. Jumlah sel dihitung pada luasan tertentu, baik yang berwarna coklat/ gelap maupun yang berwarna biru, kemudian dianalisis.

### Cara Analisis

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya dianalisis sesuai dengan bagian-bagian pokok yang dikerjakan meliputi :

#### Uji sitotoksitas

$$\% \text{kematian} = \frac{\text{Esel hidup kontrol sel} - \text{Esel hidup sampel}}{\text{Esel hidup kontrol sel}} \times 100\%$$

#### Uji antiproliferatif

Dibuat grafik hubungan antara waktu inkubasi (jam) vs jumlah sel hidup kemudian dicari persamaan regresi linearnya. Selanjutnya dicari *doubling time* dengan rumus:

$$\text{Doubling Time} = \frac{Y - A}{B} \times 100\%$$

Keterangan : Y = log ( 2 x jumlah sel hidup awal);  
A = intersep; B= slope

#### Uji imunositokimia

$$\% \text{ekspresi} = \frac{\text{Jumlah sel yang mengekspresi antibodi}}{\text{Jumlah semua sel}} \times 100\%$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji Sitotoksitas Fraksi Etanol Infusa Daun Teh

Metode penghitungan sel secara langsung dilakukan dibawah mikroskop dengan menggunakan *haemocytometer*. Penghitungan sel dilakukan dengan cepat karena larutan biru tripan dapat masuk ke dalam sel hidup (Sigma, 1999), sehingga menyebabkan sel mati dan penghitungan mengalami pembiasan karena tidak didapat jumlah yang sebenarnya. Selain itu, selama penghitungan juga ditemui adanya bidang pandang yang gelap karena afinitas larutan biru tripan terhadap protein serum lebih besar daripada afinitas terhadap protein seluler (Sigma, 1999).

Data yang tertera pada Tabel I menunjukkan bahwa semakin besar kadar senyawa uji yang diberikan pada suspensi sel maka semakin besar pula persentase kematian sel yang dihasilkan. Dari hasil regresi linier pada grafik log kadar versus angka probit pada Gambar 1 diperoleh koefisien korelasi 0,996. Koefisien korelasi hitung ini lebih besar daripada koefisien korelasi tabel yaitu 0,710, jadi ada hubungan korelasi antara log kadar dengan persentase kematian.

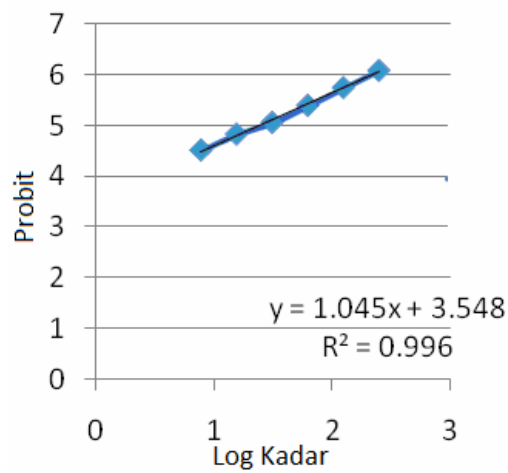
Kadar yang menyebabkan 50% populasi sel HeLa mati (LC<sub>50</sub>) dihitung dengan metode analisis probit. Analisis probit merupakan salah satu analisis regresi untuk mengetahui hubungan dosis respon (persentase kematian sel) agar diperoleh garis lurus dan dapat menentukan LC<sub>50</sub> dengan lebih akurat (Nurochmad, 2001). Dari penelitian ini diperoleh LC<sub>50</sub> adalah 24,45 µg/mL. Persamaan garis yang diperoleh dari grafik hubungan log kadar versus probit adalah Y = 1,0455 X + 3,5485. Dari persamaan tersebut didapat harga *R Square* sebesar 0,996 yang berarti 99,6 % harga pada probit konsentrasi dapat dijelaskan oleh variabel konsentrasi. Harga LC<sub>50</sub> fraksi etanol infusa daun teh mempunyai harga yang lebih kecil dari LC<sub>50</sub> ekstrak etil asetat yaitu 36,06 µg/mL (Vivi, 2004). Fraksi etanol infusa daun teh mempunyai aktivitas terhadap sel HeLa yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etil asetat.

### Uji Antiproliferatif

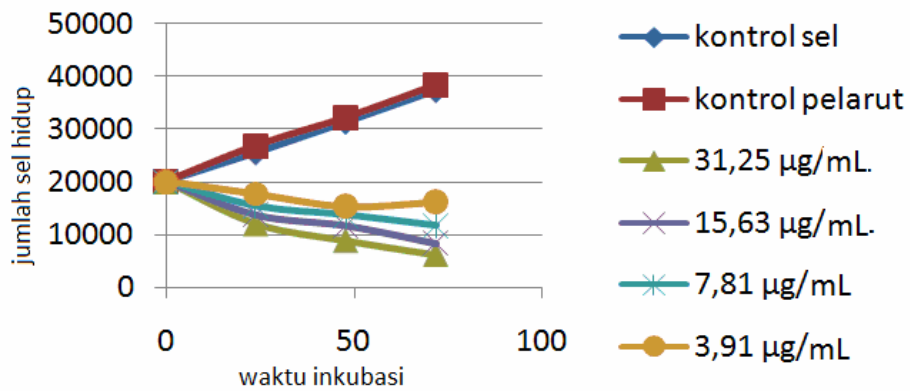
Hasil uji *doubling time* dapat dilihat pada Tabel II yang kemudian data tersebut dibuat dalam bentuk grafik dengan memplotkan antara waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3.

Jumlah sel hidup pada kontrol pelarut mengalami kenaikan (Gambar 3). Jam ke-0 sampai jam ke-24 dalam grafik tidak menunjukkan adanya *lag time* yaitu waktu dimana jumlah sel relatif tetap karena sel sedang beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Namun demikian pada fenomena ini mulai jam ke-0 sampai jam ke-72 menunjukkan kenaikan yang meningkat tajam. Hal ini menunjukkan bahwa sel telah beradaptasi dengan lingkungan. Kurva kontrol sel dengan kontrol pelarut pada setiap waktu hampir berhimpit, berarti DMSO sebagai pelarut senyawa uji relatif tidak toksik terhadap sel HeLa.

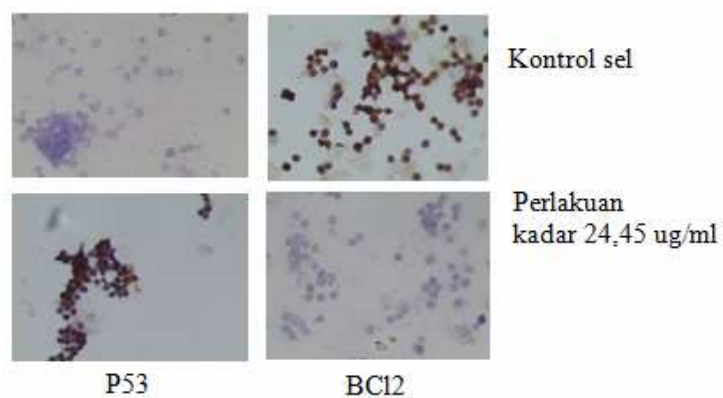
Hasil *doubling time* dengan perlakuan senyawa uji pada kadar 31,25 µg/mL; 15,63 µg/mL; 7,81 µg/mL; dan 3,91 µg/mL menunjukkan kurva yang relatif menurun (Gambar 3) sehingga dapat disimpulkan bahwa sel HeLa mengalami kematian yang kemungkinan dapat melalui mekanisme *arrest (cell cycle berhenti)*. Biasanya pada G1/S dan G2/M dulu baru mengalami apoptosis, atau langsung mengalami apoptosis (Field *et al.*, 1996).



Gambar 1. Grafik Hubungan Log Kadar fraksi etanol infusa daun teh vs Probit.



Gambar 2. Grafik hubungan log jumlah sel hidup dengan waktu inkubasi pada uji *doubling time* sel Hela oleh pengaruh fraksi etanol dari infusa daun teh.



Gambar 3 Ekspresi p53 dan bcl-2 sel HeLa oleh pengaruh fraksi etanol infusa daun teh (*Camellia sinensis*), perbesaran 100x.

Tabel I. Hasil uji sitotoksitas fraksi etanol dari infusa daun teh terhadap sel HeLa dengan metode perhitungan langsung

| Kadar ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Log kadar | Rata-rata % kematian sel | Probit |
|----------------------------|-----------|--------------------------|--------|
| 250                        | 2,3979    | $86,85 \pm 7,07$         | 6,0885 |
| 125                        | 2,0969    | $77,62 \pm 5,66$         | 5,7451 |
| 62,50                      | 1,7959    | $65,78 \pm 1,19$         | 5,3934 |
| 31,25                      | 1,4949    | $52,63 \pm 2,12$         | 5,0551 |
| 15,63                      | 1,1939    | $43,41 \pm 1,91$         | 4,8251 |
| 7,81                       | 0,8927    | $31,58 \pm 1,41$         | 4,5051 |

Tabel II Hasil Uji *doubling time* fraksi etanol dari infusa daun teh

| Perlakuan                    | Jam ke | Jumlah sel hidup replikasi- |       |       | Jumlah sel hidup |          |
|------------------------------|--------|-----------------------------|-------|-------|------------------|----------|
|                              |        | I                           | II    | III   | rata-rata        | SD       |
| Kontrol sel                  | 0      | 20000                       | 20000 | 20000 | 20000            | 0        |
|                              | 24     | 25500                       | 25500 | 25500 | 25500            | 0        |
|                              | 48     | 31500                       | 31000 | 31500 | 31333            | 288,68   |
|                              | 72     | 37000                       | 37500 | 37500 | 37333            | 288,68   |
| Kontrol pelarut              | 0      | 20000                       | 20000 | 20000 | 20000            | 0        |
|                              | 24     | 26500                       | 27000 | 27000 | 26833            | 288,68   |
|                              | 48     | 32500                       | 32000 | 32000 | 32167            | 288,68   |
|                              | 72     | 38000                       | 38000 | 39000 | 38333            | 577,358  |
| Kadar 31,25 $\mu\text{g/mL}$ | 0      | 20000                       | 20000 | 20000 | 20000            | 0        |
|                              | 24     | 12000                       | 12000 | 12000 | 12000            | 0        |
|                              | 48     | 8500                        | 9000  | 9000  | 8833             | 288,68   |
|                              | 72     | 6000                        | 6500  | 6000  | 6167             | 288,678  |
| Kadar 15,63 $\mu\text{g/mL}$ | 0      | 20000                       | 20000 | 20000 | 20000            | 0        |
|                              | 24     | 14000                       | 13500 | 13500 | 13667            | 288,68   |
|                              | 48     | 12000                       | 11500 | 11500 | 11667            | 288,68   |
|                              | 72     | 7500                        | 8500  | 9000  | 8333             | 763,768  |
| Kadar 7,81 $\mu\text{g/mL}$  | 0      | 20000                       | 20000 | 20000 | 20000            | 0        |
|                              | 24     | 15500                       | 15000 | 15500 | 15333            | 288,6751 |
|                              | 48     | 13500                       | 14000 | 13500 | 13667            | 288,6751 |
|                              | 72     | 11500                       | 11500 | 12000 | 11667            | 288,6751 |
| Kadar 3,91 $\mu\text{g/mL}$  | 0      | 20000                       | 20000 | 20000 | 20000            | 0        |
|                              | 24     | 17500                       | 18000 | 17500 | 17667            | 288,6751 |
|                              | 48     | 15500                       | 15000 | 15500 | 15333            | 288,6751 |
|                              | 72     | 16000                       | 16000 | 16500 | 16167            | 288,6751 |

Tabel III. Hasil hitung uji *doubling time* sel HeLa oleh pengaruh fraksi etanol dari infusa teh berdasarkan persamaan regresi linier

| Perlakuan                     | A (intersep) | B (slope)              | R       | <i>Doubling Time</i> (jam) |
|-------------------------------|--------------|------------------------|---------|----------------------------|
| Kontrol Sel                   | 4,306        | $3,785 \cdot 10^{-3}$  | 0,9982  | 78,22                      |
| Kontrol Pelarut               | 4,316        | $3,860 \cdot 10^{-3}$  | 0,9911  | 74,11                      |
| Sampel 30,25 $\mu\text{g/mL}$ | 4,279        | $-6,941 \cdot 10^{-3}$ | -0,9939 | Tidak ada                  |
| Sampel 15,63 $\mu\text{g/mL}$ | 4,288        | $-5,039 \cdot 10^{-3}$ | -0,9892 | Tidak ada                  |
| Sampel 7,81 $\mu\text{g/mL}$  | 4,285        | $-3,134 \cdot 10^{-3}$ | -0,9845 | Tidak ada                  |
| Sampel 3,91 $\mu\text{g/mL}$  | 4,286        | $-1,412 \cdot 10^{-3}$ | -0,8668 | Tidak ada                  |

Tabel IV. Hasil ekspresi p53 dan Bcl2 sel HeLa oleh pengaruh fraksi etanol daun teh

| Perlakuan         | Ekspresi p53 | Ekspresi bcl2 |
|-------------------|--------------|---------------|
| kontrol negatif   | 9,06 ± 1,49  | 62,88 ± 2,06  |
| Kadar 24,45 ug/mL | 57,14 ± 3,42 | 9,97 ± 0,84   |

Hasil perhitungan pada Tabel III dapat menunjukkan bahwa regresi linier log jumlah sel terhadap waktu diperoleh harga slope  $3,785 \times 10^{-3}$  untuk kontrol sel;  $3,860 \times 10^{-3}$  untuk kontrol pelarut dan diperoleh *doubling time* pada kontrol sel 78,22 dan *doubling time* pada kontrol pelarut 74,11 jam. Regresi pada sampel 31,25 µg/mL; 15,63 µg/mL; 7,81 µg/mL; dan 3,91 µg/mL menghasilkan slope negatif sehingga tidak diperoleh *doubling time* dikarenakan sel mengalami kematian. Berdasarkan hasil tersebut maka dapat disimpulkan bahwa fraksi etanol dari infusa daun teh pada kadar tersebut memiliki daya antiproliferatif terhadap sel HeLa.

**Uji Imunositokimia terhadap p53 dan bcl-2**

Hasil uji imunositokimia fraksi etanol dari infusa daun teh menunjukkan bahwa pada kadar 24,45 ug/mL menunjukkan pemacuan terhadap p53 dari 9,06 ± 1,49 menjadi 62,88 ± 2,06, terlihat pada Tabel IV dan Gambar 5. Telah dilaporkan (Jerry, *et al.*, 2002) bahwa gen p53 merupakan tumor suppressor gen yang jika terpacu maka akan meningkatkan apoptosis. Dengan demikian maka fraksi etanol dari infusa daun teh dapat digunakan sebagai antikanker dengan mekanisme pemacuan apoptosis melalui pemacuan p53.

Uji imunositokimia dilakukan untuk mengetahui ekspresi dari gen tertentu dengan melihat ekspresinya. Pengujian ini sering dilakukan untuk melihat keterjadian kanker maupun untuk melihat efek suatu obat terhadap ekspresi protein tertentu. Gen p53 dan bcl-2 berperan penting dalam kanker maupun sebagai target terapi suatu antikanker (Hemann, and Lowe, 2006). Berdasarkan uji imunositokimia pada bcl-2 dihasilkan penghambatan terhadap bcl-2 oleh pengaruh fraksi teh dibandingkan dengan kontrol negatif. Adanya penghambatan ini menunjukkan aktivitas dalam penghambatan keterjadian kanker karena bcl-2 merupakan gen yang berperan dalam anti apoptosis (Antosson and Martinou, 2000). Semakin terhambat bcl-2 tereksresi pada sel kanker diharapkan dapat memacu terjadinya kematian sel kanker.

Kandungan kimia dari teh adalah polifenol, epigalokatekin gallat (EGCG) (Yao, *et al.*, 2005),

antosian (Satta *et al.*, 2009), tannin (Akroum *et al.*, 2009) serta alkaloid purin dan kofein (Koshiishi *et al.*, 2000). Telah dilaporkan bahwa EGCG dapat berperan dalam menghambat keterjadian kanker dengan mekanisme menginduksi fragmentasi telomere pada sel kanker dan tidak pada sel normal. Selain itu EGCG juga dapat menghambat ekspresi VEGF sehingga terjadi penghambatan kanker.

Senyawa-senyawa polifenol, EGCG, flavonoid, serta tannin dapat larut dalam air panas maupun etanol (Yao *et al.*, 2005). Fraksi etanol dari infusa daun teh mengandung senyawa-senyawa dengan polaritas semipolar. Senyawa-senyawa tersebut yang dimungkinkan mempunyai aktivitas dalam pemacuan ekspresi p53 serta penghambatan bcl-2.

**KESIMPULAN**

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

Fraksi etanol dari infusa daun teh (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) mempunyai aktivitas terhadap sel HeLa dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 24,45 µg/mL.

*Doubling time* dari kontrol sel diperoleh 78,22 dan untuk perlakuan kadar 31,25; 15,63; 7,81; dan 3,91 µg/mL tidak diperoleh harga *doubling time*, sehingga dapat dikatakan pada kadar tersebut memiliki daya antiproliferatif.

Fraksi etanol dari infusa daun teh (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) mempunyai aktivitas pemacuan terhadap ekspresi gen p53 dan penghambatan bcl-2 sel HeLa.

**DAFTAR PUSTAKA**

Akroum, S., Haddi, M.L., Lalaoui, 2009, Fungal tannase degrading condensed tannins of *Camellia sinensis* and measure of the enzyme activity on quebracho, *J. of Scientific Research* 4(4):237-241  
 Akroum, S., Satta, D., Lalaoui, K., 2009, Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Algerian Plants, *Eur. J. of Scientific Research*, 31(2):289-295

- Antonsson, B., and Martinou, J.C., 2000, The Bcl-2 Protein Family, *Experimental Cell Research*, 256, 50-57
- Azis, 2009, Gynecological cancer in Indonesia, *J Gynecol Oncol*, 20(1):8-10
- Canavan TP, Doshi NR. 2000, Cervical cancer. *Am Fam Physician*, 61:1369-76
- Chen, L., Zhang, H.Y., 2007, Cancer preventive mechanisms of teh green tea polyphenol-epigallocatechin-3-gallate. *Molecules*, 3:12 (5):946-57
- Field, S.J., F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, Jr, W.G., Livingston, D.M., Orkins, S.H., Greenberg, M.E., 1996, E2F-1, Function in Mice to Promote Apoptosis and Suppress Proliferation, *Cell*, 85: 549-561.
- Hemann, M.T., Lowe S.W., 2006, The p53-Bcl-2 connection, *Cell Death and Differentiation* 13, 1256-1259
- Hongda Z., 1994, The anticancer effect and anti-DNA topoisomerase II effect of extracts of camellia ptilophylla chang and camellia sinensis, *Medicine Chinese Journal of Cancer Research*, 6(3):184-190
- Jerry, D., J., Minter, M.L., Becker, K.A., Blackburn, A.C., 2002, Hormonal control of p53 and chemoprevention, *Breast Cancer Res*, 4: 91-94
- Li W.G., Li, Q.H., Tan, Z., 2005, Epigallocatechin gallate induces telomere fragmentation in HeLa and 293 but not in MRC-5 cells, *Life Sc.*, 76(15):1735-1746
- Nishimura, A., Nakahara, T., Ueno, T., Sasaki, K., Yoshida, S., Kyo, S., Howley, P.M., and Sakai, H., 2006, Requirement of E7 oncoprotein for viability of HeLa cells, 8: 984-993
- Nurrochmad, A., 2001, Sintesis Kurkumin, Bisdemetoksi Kurkumin, Bisdemetoksi-dehidroksikurkumin dan Pentagamavunon-O serta Uji Ketoksikannya terhadap Sel Meiloma dan Sel Mononuklear Normal secara *In Vitro*, Tesis, Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.2004, Flavonoid biosynthesis in teh tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of teh prominent epicatechin and catechin pathways, *Arch Biochem Biophys*, 431(1):22-30
- Ravindranath, M.H, Saravanan, T.S., Monteclaro, C.C., Presser N., Xing Ye, X., Selvan, S.R., and Brosman, S, 2006, Epicatechins Purified from Green Tea (*Camellia sinensis*), Differentially Suppress Growth of Gender-Dependent Human Cancer Cell Lines, *Advance Access Publication*, 3(2)237-47
- Sigma, 1999, *Biochemicals and Reagents for Life Science Research*, Sigma Aldrich CO, Singapore, 1873.
- Teissier, S., Pang, C.L., and Thierry, F., 2010, The E2F5 repressor is an activator of E6/E7 transcription and of the S-phase entry in HPV18-associated cells, *Oncogene*, 29(36):5061-70.
- Yao, L., Caffin, N., Darcy, B., Jiang, Y., Shi, J., Singanusong, R., Liu, X., Datta, N., Kakuda, Y., Xua, Y., 2005, Seasonal Variations of Phenolic Compounds in Australia-Grown Tea (*Camellia sinensis*), *J. Agric. Food Chem.*, 53 (16), pp 6477-6483